

Afdeling Microbiologie                      1982-11-18  
Verslag: 83.6                                  Pr.nr. 505.0030

Onderwerp: De isolatie van Campylobacter  
jejuni uit kip-filet.

Bijlage: 1

Verzendlijst: directeur, direktie VKA    sektorhoofd (3x), afdeling  
Microbiologie (4x), afdeling Normalisatie (Humme),  
Projektbeheer, projekteider.



Afdeling Microbiologie

Datum: 1982-11-18

VERSLAG: 83.6

Pr.nr. 505.0030

Projekt: Ontwikkeling van microbiologische onderzoekmethoden voor  
diverse landbouw en visserijprodukten.

Onderwerp: De isolatie van Campylobacter jejuni uit kip-filet.

---

Doel:

Het opdoen van ervaring m.b.t. de isolatie en determinatie van Campylobacter jejuni uit kip-filet.

Het opstellen van een intern analysevoorschrift.

Samenvatting:


Campylobacter jejuni wordt de laatste jaren steeds vaker in verband gebracht met acute bacteriële gastro-enteritis bij de mens. Vooral kip, kalkoen, rauwe melk en water worden als infectiebron beschouwd. Contact met het RIV leverde de gegevens en teststammen op voor de beschreven methode.

Conclusie:



Van de onderzochte kip-filet bleek 22% besmet te zijn met Campylobacter jejuni.

De gebruikte z.g. thal-bouillon onderdrukt in onvoldoende mate storende flora van Pseudomonas sp en Enterobacteriaceae. Het gebruik van een drietal (selectieve) bloedplaten is vooralsnog noodzakelijk, ook om de nodige ervaring op te doen m.b.t. de beoordeling van verdachte kolonies.

---

Verantwoordelijk: N. Broex 

Medewerkers/samenstellers: H. v. Velzen, A. Brandwijk

Projektleider: N. Broex  

## 1. Inleiding

### 1.1 Algemeen

Campylobacter jejuni is een slank gebogen, spiraalvormig gekromd staafje 0,2-0,5  $\mu\text{m}$  breed, 1,5-5  $\mu\text{m}$  lang, niet sporevormend.

Voorkomend als komma, S, en spiraalvorm.

In oudere cultures worden de cellen sferisch en zelfs coccoid.

Bergey's manual deelt Campylobacter in in:

Part. 6, Spiral and curved Bacteria

Fam. I Spirillaceae Genus I Spirillum

Genus II Campylobacter

campylo = gebogen, gekromd

bacter = staaf

jejuni = uit het jejunum.

Zeer actief beweeglijke cel met karakteristieke spiraal met draaiende en snelle beweging in alle richtingen.

Bezit 2 polaire flagellen, maar door het snel om de asdraaien van de cel is de kurketrekkerstructuur vaak moeilijk te zien.

### 1.2 Micro-aerofiele incubatie.

Campylobacter jejuni is obligaat micro-aerofiel, de optimum

O<sub>2</sub> concentratie is 6%.

CO<sub>2</sub> is voor groei noodzakelijk en ter verkrijging van dit milieu werden z.g. Gas Pak anaerobic gas enveloppen van B.B.L. gebruikt.

Via voorproeven werd door ons gekozen voor kweken in metalen blikken, hierin geplaatst afhankelijk van de grootte 1 of 2 enveloppen voor resp. 3,5 of 6,5 l inhoud.

De blikken werden met tape lekdicht gemaakt.

### 1.3 Selektieve media voor isolatie.

Als voorophopingsmedium wordt gebruikt z.g. Thal bouillon bestaande uit:

thioglucollaat 10 ml

paardebloed 7%

vancomycine 40  $\mu\text{g/ml}$

trimethoprim 20  $\mu\text{g/ml}$ .

polymyxine B      10 IE/ml  
actidione          100 µg/ml  
laurylsulfaat      0,1%  
cephalotine        180 µg/ml

N.B. Genoemde thal-bouillon is van dubbele sterkte.

#### Isolatiemedia.

Basis: Blood-agar Base no. 2.

- 1) Basis + Campylobacter-groeisupplement + Skirrow-antibioticasupplement + 7% paardebloed
- 2) Basis + Campylobacter-groeisupplement + Butzler-antibioticasupplement + 7% schapebloed
- 3) Basis + Campylobacter-groeisupplement + 7% schapebloed.

#### Campylobacter-groeisupplement:

natriumpyruvaat (250 µg/ml); natriummetabisulfiet (250 µg/ml); ferro-sulfaat (250 µg/ml), Oxoid SR 84 kant en klaar gelyofiliseerd.

#### Skirrow-antibioticasupplement:

vancomycine (10 µg/ml); polymyxine B (2,5 IE/ml); trimethoprim (5 µg/ml), Oxoid SR 69 kant en klaar gelyofiliseerd.

#### Butzler-antibioticasupplement:

bacitracine (25 IE/ml); cycloheximide (50 µg/ml); colistine (10 µg/ml); cefazoline (15 µg/ml); novobiocine (5 µg/ml), Oxoid SR 85 kant en klaar gelyofiliseerd.

#### 1.4 Antibiotica en chemoterapeutica gevoeligheid van Campylobacter jejuni.

<u>Antibacterieel middel</u>	<u>% gevoelige stammen</u>
gentamycine	100%
streptomycine	97%
chlooramphenicol	97%
penicilline	0%
bacitracine	7%
lincomycine	0%
cloxacilline	0%

De antibiotica gevoeligheid van *Campylobacter jejuni* komt sterk overeen met die van *Ps. aeruginosa*, welke dus als stoorstam te verwachten is.

### 1.5 Biochemische eigenschappen van *Campylobacter jejuni*.

De meest kenmerkende eigenschappen ter onderscheiding van andere *Campylobacter* soorten (*C. intestinales* en *C. coli*) zijn:

katalase	+
oxidase	+
H <sub>2</sub> S vorming	-
urease	-
glucose omzetting	-
geen groei	25°C
geen groei in	3,5% NaCl
groei	43°.

## 2. Materiaal en methoden

### 2.1 Monsterherkomst.

Wij ontvingen 50 monsters kip-filet, de monsters waren afkomstig van de markt, supermarkt, poelier, slager en slachterij-poelier.

Monsters werden tijdens het vervoer bij koelkasttemperatuur bewaard en bij aankomst zo spoedig mogelijk onderzocht, in alle gevallen binnen 2 dagen (bewaartemperatuur op het lab 0°C).

<u>Plaats van herkomst</u>	<u>Codenummers</u>
markt	1; 9; 16; 17; 26; 27; 28; 40 en 41
supermarkt	3; 10; 22; 30; 31; 34; 43; 44 en 47
poelier	2; 4; 5; 7; 8; 11; 12; 13; 15; 19; 21; 23; 24; 29; 42; 45 en 50
slagerij	6; 14; 18; 20; 25; 33; 35; 36; 48 en 49
slachterij-poelier	32; 37; 38; 39; 46.

### 2.2 Monstervoorbewerking.

Een gehele filet werd in een steriele plastic zak m.b.v. 100 ml pepton-fysiologische-zoutoplossing krachtig geschud, vervolgens werd de vloeistof onderzocht op de aanwezigheid van *Campylobacter jejuni*.



### 2.3 Beënten, bebroeden en isolatie.

10 ml kipvloeistof werd in drievoud geënt in 10 ml thal-bouillon, na 24 uur micro-aerofiel incuberen bij 37°C werd afgestreken op bloedplaten (zoals genoemd in 1.3).

Vervolgens werd gedurende 48 uur bij 43°C geïncubeerd.

Campylobacter verdachte kolonies werden m.b.v. een hangend druppel preparaat onder de fasecontrastmicroscop (1000x) bekeken en eventueel rein gestreken.

Van de plaat werden oxidase en katalase reactie uitgevoerd en een BHI-bouillonbuis geënt.

### 2.4 Identificatie.

Vanuit BHI-bouillonbuis werden een TSI-buis voor H<sub>2</sub>S productie, ureumbuis voor ureaseproductie, een Schaedlerbuis met 40 µg/l fenolrood voor glucose-omzetting en een BHI-bouillonbuis geënt voor groei bij 25° (5 dagen).

Vanzelfsprekend werden de bonte reeksen micro-aerofiel geïncubeerd bij 37° resp 25°C.

Campylobacter jejuni werd aantoonbaar geacht, wanneer uit één of meer van de drie oorspronkelijke buizen spirilvormige, katalase + oxidase + H<sub>2</sub>S - glucose - urease - en BHI 25°C - bacteriën konden worden geïsoleerd.

### 3. Resultaten

Code	RIKILT nummer	Campylobacter jejuni pos. cq. neg. aantal buizen van de 3 pos.
1	24698	negatief
2	24699	negatief
3	24700	negatief
4	24701	negatief
5	24702	negatief
6	24703	negatief
7	24704	negatief
8	24705	negatief
9	24706	negatief

Code	RIKILT nummer	Campylobacter jejuni pos. cq. neg. <u>aantal buizen van de 3 pos.</u>
10	24707	2 x pos.
11	24708	3 x pos.
12	24709	2 x pos.
13	24710	negatief
14	24711	negatief
15	24712	2 x pos.
16	24713	negatief
17	24714	negatief
18	25181	negatief
19	25182	negatief
20	25183	negatief
21	25184	negatief
22	25185	negatief
23	25186	negatief
24	25187	negatief
25	25188	negatief
26	25189	negatief
27	25190	negatief
28	25191	1 x pos.
29	25192	negatief
30	25193	2 x pos.
31	25194	2 x pos.
32	25195	negatief
33	25196	negatief
34	25197	negatief
35	25198	negatief
36	25199	negatief
37	25770	2 x pos.
38	25771	negatief
39	25772	negatief
40	25773	negatief
41	25774	negatief
42	25775	negatief
43	25776	2 x pos.



Code	RIKILT nummer	Campylobacter jejuni pos. cq. neg. aantal buizen van de 3 pos.
44	25777	negatief
45	25778	negatief
46	25779	negatief
47	25780	negatief
48	25781	2 x pos.
49	25782	negatief
50	25783	2 x pos.

#### 4. Discussie

Onderstaande tabel geeft het meest waarschijnlijke aantal (MPN) Campylobacters jejuni aan met 95% en 99% grenzen.

Het uitgevoerde aantal tests is 3 (drie buizen per monster) met 10 ml vloeistof (PFZ wasvloeistof totaal 100 ml).

Aantal positief (p) (van de drie)	MPN per 100 ml	95% grens		99% grens	
		laagste aantal per 100 ml	hoogste aantal per 100 ml	laagste aantal per 100 ml	hoogste aantal per 100 ml
0	-	-	10	-	16
1	4	0,2	20	0,03	29
2	11	1,4	4,1	0,6	58
3	-	4	-	2	-

Door ons werd het volgende totaal gevonden:

1 buis positief	1 maal
2 buizen positief	9 maal
3 buizen positief	1 maal.

In 9 van de 11 gevallen dat Campylobacter jejuni werd aangetoond was dit in 2 van de drie geteste buizen, met 99% betrouwbaarheidsgrens duidt dit op een aantal Campylobacters jejuni tussen 0,6-58 per 100 ml wasvloeistof.

Hetgeen laag te noemen is.

- Media: 1. bloedplaten (schapebloed) zonder antibiotica  
2. bloedplaten (schapebloed) + antibioticasupplement volgens Butzler  
3. bloedplaten (paardebloed) + antibioticasupplement volgens Skirrow.

1. Medium is veelal overgroeid met storende *Pseudomonas* en *Enterobacteriaceae* flora, *Campylobacter jejuni* is slechts in enkele gevallen aanwezig echter vaak overgroeid.

In geen der gevallen is dit medium gebruikt voor verdere determinatie.

2. Dit medium bevat vaak nog wel *Pseudomonas* als storende flora echter in veel mindere mate, *Campylobacter jejuni* was steeds goed te isoleren en duidelijk aanwezig.

In de meeste gevallen werd vanaf dit medium verdere determinatie uitgevoerd.

3. Het z.g. Skirrow medium bevatte behalve de *Pseudomonas* sp. ook vaak *Enterobacteriaceae* flora. *Campylobacter jejuni* is vaak wel aanwezig echter alleen door reinstrijken goed te isoleren alvorens te determineren.

Dit werd door ons als minder prettig ervaren.

Algemeen: De aantallen verdachte kolonies waren vaak zeer laag in aantal (1-5) aanwezig en verspreid (zwermend) op de platen aanwezig.

De onderzochte kip-filet bevatten hoge aantallen bacteriën andere dan *Campylobacter jejuni*.

Kiemgetal mesofiel gemiddeld  $6,7 \times 10^7$  kve/g.

*St. aureus*  $10^2$  kve/g in alle gevallen werd *E-coli* aangetoond en in 10% van de onderzochte monsters werd *Salmonella* aangetoond.

De storende flora werd door het gebruikte ophopingsmedium (thalbouillon) niet voldoende onderdrukt en afstrijken op de verschillende media (1.3) plus incubatie bij 43°C was niet afdoende om vooral *Pseudomonas* en *Enterobacteriaceae* flora te onderdrukken.

## 5. Literatuur

5.1 *Campylobacter jejuni* in cattle and in raw milk in the Netherlands.

J. Oosterom, G.B. Engels, R. Peters, R. Pot.

Laboratorium voor Zoönosen en Levensmiddelenmicrobiologie R.I.V.

Bilthoven.

5.2 R.I.V. Rapport nr. 38/79: Zoön 1979.

Literatuuroverzicht.

J. Oosterom, L.M. van Noorle Jansen.

5.3 Beurteilung des bakteriologischen Status frischen Geflügels in

Läden und auf Märkten, Fleischwirtschaft 61, 131-134.

Notermans, Oosterom, Beckers, Erne.

5.4 *Campylobacter jejuni* and Food.

Food technology 89 March 1982.

M.J. Blaser.

5.5 *Campylobacter* een "nieuwe" veroorzaker van voedselvergiftiging.

De Ware(n) Chemicus 8 (1978) 143-144.

Bouwer-Hertzberger en Hage.

5.6 *Campylobacter fetus* subspecies *jejuni* bij pluimvee.

Tijdschrift Diergeneeskunde 105 afl. 17 (1980).

Gozen en De Jong.

5.7 De isolatie van *Campylobacter jejuni* uit voedingsmiddelen -

spreidplaatmethode.

De Ware(n) Chemicus 12 (1982) 14-23.

De Boer en Hartog.

5.8 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.

Eight edition, part 6.

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT nr. E 44

1e oplage (1982-11-17)

ISOLATIE VAN CAMPYLOBACTER JEJUNI UIT VOEDINGSMIDDELEN

Verzendlijst: bibliotheek (5x), sectorchef, afd. Normalisatie/-  
Harmonisatie, afd. Microbiologie (3x)

Isolatie van *Campylobacter jejuni* uit voedingsmiddelen.

1. Grensreactie.

2. Definitie.

*Campylobacter jejuni* wordt geacht aanwezig te zijn indien, na bebroeding in een ophopingsmedium, op de voorgeschreven werkwijze, en na kweken op een drietal (selektieve) media kolonies geïsoleerd kunnen worden die na identificatie m.b.v. een aantal biochemische reacties en afwezigheid van groei bij 25°C de voor *Campylobacter jejuni* specifieke reacties geven.

3. Beginsel.

Na ophoping, onder micro-aerofiele omstandigheden bij 37°C, wordt geënt op (selektieve) bloedplaten en onder micro-aerofiele omstandigheden bij 43°C bebroed; verdachte kolonies worden geïdentificeerd.

4. Media en Reagentia.

4.1 Ophopingsmedium (Thal-bouillon) \*

Samenstelling

thioglycolaat medium USP	- 30,1 g
gelyseerd paardebloed	- 60 ml
antibiotica-oplossing	- 120 ml
natriumdodecylsulfaatoplossing	- 48 ml
gedestilleerd water	- 420 ml.

Los de thioglycolaat onder verwarming in het water op. Steriliseer 15 min. bij 120°C. Koel af tot 50°C en voeg aseptisch toe het paardebloed (4.6) de antibiotica oplossing (4.1.2) en de natrium dodecylsulfaat (4.1.3). Vul af 10 ml in cultuurbuizen (20x200 mm).

4.1.2 Antibioticaoplossing \*

\* zie bijlage



#### Samenstelling

vancomycine - 1 g  
polymyxine-B-sulfaat - 0,25 g  
trimethoprim - 0,50 g  
actidione - 2,5 g  
cephalotine - 2,5 g  
gedestilleerd water - 2,5 l.

Los de trimetoprim op in 2 ml DMF (dimethylformamide (4.17)).

Los de actidione op in 1 ml aceton (4.18) en los de vancomycine, de polymyxine en cephalotine op in 100 ml water.

Voeg vervolgens alle oplossingen bij elkaar. Vul aan met water tot 2,5 liter en steriliseer de oplossing d.m.v. filtratie.

#### 4.1.3 Natrium-dodecyl-sulfaatoplossing. \*

##### Samenstelling

natriumdodecylsulfaat 2,5 g  
steriel gedestilleerd water 100 ml.

Los de natriumdodecylsulfaat op in het water, sterilisatie is niet nodig.

#### 4.2 Bloed agar base no. 2 \*

##### Samenstelling

proteose pepton - 15 g  
leverextract - 2,5 g  
gistextract - 5,0 g  
natriumchloride - 5,0 g  
agar - 12,0 g.

Los de ingrediënten in het water op, stel de pH zodanig in dat deze  $7,4 \pm 0,1$  bedraagt bij 25°C.

Vul af in geschikte porties en steriliseer gedurende 20 min. bij 120°C.

\* Zie bijlage



#### 4.3 Campylobactergroei-supplement. \*

Gebruik het in de handel verkrijgbare lyofiel gedroogde preparaat.  
Reconstitueer volgens fabrieksvoorschrift.

#### 4.4 Campylobacter selectief supplement volgens Skirrow. \*

Gebruik het in de handel verkrijgbare lyofiel gedroogde preparaat.  
Reconstitueer volgens fabrieksvoorschrift.

#### 4.5 Campylobacter selectief supplement volgens Butzler. \*

Gebruik het in de handel verkrijgbare lyofiel gedroogde preparaat.  
Reconstitueer volgens fabrieksvoorschrift.

#### 4.6 Steriel gedefibrineerd paardebloed. \*

#### 4.7 Steriel gedefibrineerd schapebloed. \*

#### 4.8 Isolatie media.

4.8.1 Basismedium (4.2) + campylobactergroei-supplement (4.3) + 7%  
steriel schapebloed (4.7).

4.8.2 Basismedium (4.2) + campylobactergroei-supplement (4.3) + selectief  
supplement (4.4) + 7% steriel paardebloed (4.6).

4.8.3 Basismedium (4.2) + campylobactergroei-supplement (4.3) + selec-  
tief supplement (4.5) + 7% steriel schapebloed (4.7).

#### 4.9 Brain-heart-infusion broth (B.H.I.-bouillon) \*\*

##### Samenstelling

aftreksel van kalfshersenen (droog)	12,5 g
aftreksel van runderhart (droog)	5 g
proteose pepton	10 g
glucose	2 g
natriumchloride	5 g
dinatriumwaterstoffosfaat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	2,5 g
water	1000 ml.

\* Zie bijlage.

\*\* In gedroogde vorm in de handel verkrijgbaar onder de naam Brain-  
heart-infusion broth.

Los de ingrediënten in water op, stel de pH zodanig in dat deze  $7,4 \pm 0,1$  bij  $25^{\circ}\text{C}$  bedraagt.

Vul af in porties van 5 ml en steriliseer gedurende 20 min. bij  $120^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.10 Pepton-fysiologische zoutoplossing.

Samenstelling.

pepton - 1 g  
natriumchloride - 8,5 g  
water - 1000 ml.

Los de ingredienten op in het water.

Vul af in porties van 9 ml, 90 ml of voorzover nodig.

Steriliseer gedurende 20 min. bij  $120^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.11 Katalase reagens.

Bereid, onmiddellijk voor gebruik, een oplossing van de volgende samenstelling:

waterstofperoxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 30% 10 ml  
water 90 ml.

Uitvoering.

Breng met behulp van een platina entnaald een gedeelte van de te onderzoeken kolonie op een objectglasje en voeg 1 druppel reagens toe. Als gasvorming (belletjes) wordt geconstateerd is de reactie positief.

#### 4.12 Reagens voor de oxydasereactie \*

Bereid onmiddellijk voor het gebruik een oplossing van de volgende samenstelling:

N,N,N',N'-tetramethylparafenylenediamine-2 HCl 1 g  
gedemineraliseerd water 100 ml.

\* De in de handel verkrijgbare kant en klare strips zijn eveneens bruikbaar.

#### 4.13 Medium voor glucose fermentatie \*

##### Samenstelling

trypton soya bouillon	- 10 g
speciaal pepton	- 5 g
gistextract	- 5 g
glucose	- 5 g
cysteïne HCl	- 0,4 g
haemine	- 0,01 g
tris buffer	- 0,75 g
agar	- 13,5 g
fenolrood	- 40 µg/ml
gedestilleerd water	- 1000 ml.

Los de ingrediënten onder verwarmen in het water op. Stel de pH zo in dat deze na sterilisatie  $7,6 \pm 0,1$  bedraagt. Vul af in buizen van 18 x 150 mm in hoeveelheden van 15 ml en steriliseer gedurende 20 min. bij 120°C.

#### 4.14 Ureum-medium

##### Samenstelling

##### Basismedium \*\*

pepton	1 g
glucose	1 g
natriumchloride	5 g
monokaliumfosfaat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	2 g
fenolrood	12 mg
agar	15 g
gedemineraliseerd water	950 ml.

Los de ingrediënten onder verwarming in het water op. Stel de pH zodanig in, dat deze na sterilisatie  $6,8 \pm 0,1$  bedraagt bij 25°C.

Steriliseer gedurende 20 min. bij 120°C en koel af tot ca. 50°C.

\* In de handel verkrijgbaar zonder fenolrood onder de naam Schaedler Medium

\*\* In gedroogde vorm in de handel verkrijgbaar onder de naam Urea

Agar Base.

#### 4.14.2 Ureumoplossing \*

##### Samenstelling

ureum 20 g

gedemineraliseerd water 50 ml.

Bereid een oplossing van bovenaangegeven samenstelling en steriliseer deze door middel van filtratie.

\* In steriele oplossing in ampullen in de handel verkrijgbaar.

#### 4.14.3 Bereiding

Voeg basismedium en ureumoplossing in de bovenaangegeven hoeveelheden onder aseptische omstandigheden bij elkaar. Vul onder aseptische omstandigheden af in buizen à 7 ml per buis en laat in schuine stand stollen.

#### 4.15 Triple Sugar Iron Agar (T.S.I. agar) \*

##### Samenstelling

vleesextractpoeder 3 g

gistextractpoeder 3 g

pepton 15 g

glucose 1 g

lactose 10 g

saccharose 10 g

ijzersulfaat 0,2 g

natriumchloride 5 g

natriumthiosulfaat 0,3 g

agar 12 g

fenolrood 0,024 g

gedemineraliseerd water 1000 ml.

Los de ingrediënten onder verwarming in het water op. Stel de pH zodanig in, dat deze na sterilisatie  $7,4 \pm 0,1$  bedraagt bij 25°C. Vul af in buizen à 7 ml per buis en steriliseer gedurende 20 min. bij 120°C. Laat de buizen in schuine stand stollen, maar op dusdanige wijze, dat deze, gerekend vanaf de onderkant, over een lengte van ca. 2,5 cm nog geheel met agar zijn gevuld.

\* In gedroogde vorm onder deze naam in de handel verkrijgbaar.



4.16 Gas Pak Disposable Hydrogen + Carbon Dioxide Envelope (BBL) \*  
Sachets voor het micro-aerofiel kweken. (Zie gebruiksaanwijzing van de fabrikant.)

4.17 Dimethylformamide p.a.

4.18 Aceton p.a.

5. Apparatuur en glaswerk.

Het glaswerk moet bestand zijn tegen herhaald steriliseren.

5.1 Cultuurbuizen 20x200 mm en 18x150 mm.

5.2 Kolfjes voor voedingsmedia en verdunningsvloeistof.

5.3 Pipetten met schaal met een meetvolume van 10 ml en verdeeld tot in 0,1 ml en van 1 ml verdeeld tot in 0,1 ml.

5.4 Petrischalen met diameter van 9 cm.

5.5 Broedstoven voor het kweken van de cultures bij  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$  en  $43 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

5.6 Anaerobe kweekpot (zonder  $\text{O}_2$  katalysator) of anderszins bruikbare afsluitbare containers.

5.7 Waterbad van  $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$  voor gereed houden van de voedingsbodems.

5.8 Toestellen voor het steriliseren van het glaswerk en de voedingsbodem op de voorgeschreven wijze.

5.9 Fase contrast microscoop.

5.10 Filtratatie apparatuur.

\* zie bijlage

## 6. Werkwijze.

### 6.1 Monstervoorbewerking.

#### 6.1.1 Vlees - Vleesprodukten

Weeg van een representatief deel van het produkt 10 g af in een steriele plastic zak, voeg 90 ml pepton-fysiologische zoutoplossing (4.10) toe. Meng met behulp van een z.g. Stomacher.

Indien 10 g monster i.v.m. de te verwachten besmettingsgraad niet voldoende monster blijkt, dan kan het gehele of gedeeltelijke produkt m.b.v. pepton-fysiologische zoutoplossing (4.10) in een adequate steriele plastic zak geschud worden.

#### 6.1.2 Vloeibare produkten

Homogeniseer de te onderzoeken vloeistof d.m.v. goed mengen, onderzoek door direkte enting in thal-bouillon (4.1).

### 6.2 Beënting en bebroeden.

Breng terstond 10 ml monster verkregen volgens 6.1.1 of 6.1.2 in drievoud over in 10 ml thal-bouillon (4.1). Incubeer in micro-aerofiel milieu gedurende 24 uur bij  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### 6.3 Isolatie

Na 24 uur wordt m.b.v. een öse afgeënt vanuit de thal-bouillon (4.1) op de media 4.8.1, 4.8.2 en 4.8.3.

De platen worden gedurende 48 uur micro-aerofiel bij  $43^\circ + 1^\circ\text{C}$  geïncubeerd.

Campylobacter jejuni verdachte kolonies zijn:

kleine, ronde, bolle, glanzende, bruinachtige of grijsbruinachtige kolonies die vaak de entstreep volgen en zelfs zwermen.

### 6.4 Identificatie

Verdachte kolonies worden m.b.v. een hangend druppelpreparaat onder de fasecontrastmicroscopie bekeken.

Campylobacter is een kleine uiterst beweeglijke spiraalvormige bacterie.



Indien nodig wordt een verdachte kolonie reingestroken op medium (4.8.3). Verdachte kolonies worden geënt in 5 ml BHI-bouillon (4.9). Vanaf de bloedplaat wordt getest op oxidase en katalase alvorens de biochemische reacties uitgevoerd worden (4.11 en 4.12).

#### 6.5 Identificatiereacties.

##### 6.5.1 H<sub>2</sub>S vorming in Triple Sugar Iron agar

Beënt de buizen met het onder (4.15) genoemde medium door het afstrijken op het oppervlak en steek ent in het onderste deel van de buis; bebroed micro-aerofiel gedurende 24-48 uur bij  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Beoordeling:

voetzwart: H<sub>2</sub>S vorming positief.

##### 6.5.2 Ureumsplitsing

Beënt het oppervlak van het volgens (4.14) bereide medium en bebroed micro-aerofiel gedurende 24-48 uur bij  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Splitsing van ureum leidt tot ammoniakontwikkeling, waardoor de kleur van de indicator naar rood omslaat.

##### 6.5.3 Glucose reactie

Beënt d.m.v. een steek het volgens (4.13) bereide medium en bebroed micro-aerofiel gedurende 24-48 uur bij  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . Bij een positieve glucosereactie verandert de kleur van rood naar geel.

##### 6.5.4 Groei bij $25^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ in BHI-bouillon

Beënt m.b.v. een öse het volgens (4.9) bereide medium.


Incubeer micro-aerofiel gedurende 5 dagen bij  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

De reactie is positief indien na 5 dagen groei opgetreden is.

#### 7. Interpretatie.

Campylobacter jejuni wordt aantoonbaar geacht wanneer uit één of meer van de drie oorspronkelijke buizen bacterien kunnen worden geïsoleerd met de volgende eigenschappen:

Microscopisch : beweeglijke spiril  
Katalase : +  
oxidase : +  
H<sub>2</sub>S vorming : -  
glucose omzetting : -  
urease : -  
groei bij 25°C : -

Verantwoordelijk: N.J.G. Broex 

Samensteller: H. van Velzen

HV

Bijlage 1.

1. Fluid Thioglycollate Medium U.S.P.  
500 g BBL. 11260.
2. Vancomycine  
Vancocin. HCl 500 mg Lilly.
3. Polymyxine B.sulfaat.  
7400 IE/mg Sigma.
4. Trimethoprim  
500 mg. Hoffman la Roche.
5. Actidione  
1000 mg. Sigma.
6. Cephalotine.  
1000 mg. Sigma.
7. Natrium dodecyl sulfaat.  
500 g BDH 44244.
8. Blood agar base no. 2.  
500 g. Oxoid.
9. Campylobacter Growth. Supplement.  
Oxoid SR 84.
10. Campylobacter supplement vlg. Skirrow.  
Oxoid SR 69.
11. Campylobacter supplement vlg. Butzler.  
Oxoid SR 85.
12. Steriel paarde- en schapebloed.  
Fa. Johnny Rottier, Kloosterzande.
13. BBL. Gaspak anaerobic systems.  
Dispoable Hydrogen + Carbon dioxide generator.  
Envelope BBL 70304.